



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND

DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 101 26 472 A 1

⑯ Int. Cl. 7:
A 61 K 31/711
A 61 K 48/00
C 12 Q 1/68

DE 101 26 472 A 1

⑯ Aktenzeichen: 101 26 472.0
⑯ Anmeldetag: 31. 5. 2001
⑯ Offenlegungstag: 5. 12. 2002

⑯ Anmelder:
Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin,
13125 Berlin, DE

⑯ Vertreter:
Baumbach, F., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
13125 Berlin

⑯ Erfinder:
Brett, Dave, Dr., 13187 Berlin, DE; Kemmner,
Wolfgang, Dr., 13469 Berlin, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑯ Verwendung des Nachweises der Expression von Splice-Varianten von Gen21 für die Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen
⑯ Die Erfindung betrifft die Verwendung von Splice-Varianten der Sequenz Gen21 für die Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen. Die mRNA-Expression einer Splice-Variante der Sequenz Gen21 ist in kolorektalen Karzinomen später Stadien reduziert oder nicht vorhanden. Untersuchungen an 100 gut dokumentierten Fällen kolorektaler Karzinome zeigen, daß die Expression der Splice-Variante der Sequenz Gen21 einen prognostischen Faktor für das Überleben solcher Patienten darstellt. Die Aktivierung der Expression dieser Sequenz durch pharmazeutische Mittel ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

DE 101 26 472 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft die Verwendung von Splice-Varianten der Sequenz Gen21 für die Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

[0002] In Arbeiten der Arbeitsgruppe von John D. Minna wurde durch somatisches genetisches Mapping von Tumorzelllinien, Tumoriopsien und von prämalignen Läsionen aus humanen Lungen- und Brustgewebsproben ein Bereich auf Chromosom 3p21.3 entdeckt, der möglicherweise Tumor-Suppressorgene enthält (1). In diesem Bereich, der etwa 630 Kilobasen umfaßt, wurden 25 Gene gefunden. Vier dieser Gene zeigten eine verringerte mRNA-Expression in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen. In 6 dieser Gene, darunter in Gen21, wurden Mutationen gefunden, die zur Bildung einer veränderten Aminosäuresequenz führten. Allerdings trat keine dieser Mutationen in mehr als 10% der getesteten Lungenkarzinome auf, und es ist nichts über die prognostische Bedeutung dieser Gene bekannt. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß das postulierte Tumorsuppressorgen bisher nicht nachgewiesen werden konnte, und daß vor allem die Sequenz Gen21 nicht als Tumorsuppressorgen identifiziert wurde. Darüber hinaus wurden bisher keine Daten über ein Vorkommen oder eine Funktion von Gen21 in kolorektalen oder anderen Karzinomen publiziert.

[0003] Die Aufgabe der Erfindung bestand darin, neue Tumorsuppressorgene auf Chromosom 3p21.3 zu finden, die für die Diagnose und die Therapie von Tumorerkrankungen geeignet sind.

[0004] Überraschend wurde gefunden, daß in kolorektalem Gewebe zumindest 2 Splicevarianten von Gen21 auftreten, die als Gen217 und Gen215 bezeichnet werden. Dabei handelt es sich bei Gene215 um eine Splicevariante von Gen217, der zwei Sequenzabschnitte fehlen. Die mRNA-Sequenz von Gen215 ist daher kürzer als die von Gen217. Dies gilt allerdings nicht für die Proteinsequenz. Da die RNA-Sequenz von Gen217 ein Stop-Kodon enthält, ist die kodierte Peptidsequenz von Gen217 gegenüber der von Gen215 verkürzt.

[0005] Die Gensequenzen von Gen215 und Gen217 sind in den Abb. 2 und 3 dargestellt.

[0006] In Untersuchungen von kolorektalem Gewebe, die mit der Microarray-Technologie von Affymetrix (Gene-Chip) durchgeführt wurden, zeigte sich, daß die Expression von Gen215 in gesundem Kolongewebe 5-mal höher ist als in Karzinomgewebe. Untersuchungen von kolorektalen Karzinomen von 102 Patienten mit quantitativer RT-PCR (One-step multiplex Taqman-PCR) ergaben, daß Gen215 in etwa 40% der Fälle nicht exprimiert wurde. Statistische Auswertungen zeigten einen deutlichen Einfluß der Expression von Gen215 auf das Überleben der Patienten (log rank, $p = 0.04$).

[0007] Erfindungsgemäß wird deshalb mit Gen215 eine Substanz bereitgestellt, die zu prognostischen, diagnostischen und therapeutischen Zwecken bei Tumorerkrankungen verwendet werden kann. Die Expression von Gen215 stellt einen prognostischen Faktor zur Diagnose von Tumorerkrankungen dar. Gegenstand der Erfindung ist deshalb der Einsatz von Gen215 für die Prognose, wobei die Konzentration des Gen215 Proteins und/oder die Expression ihrer sie kodierenden Gene bestimmt wird, z. B. durch Bestimmung der mRNA Expression mittels RT-PCR oder Expressionsbestimmung mit Hilfe von Microarrays durch Immobilisierung einer entsprechenden Oligonukleotidsequenz.

[0008] Durch Messungen der Expression von Gen215 in Tumorgewebe aus Resektaten oder Biopsien von Patienten können Prognosen für das Überleben (die Lebenserwartung

z. B. nach Operationen oder chemotherapeutischen Behandlungen) eines Patienten gemacht werden. Wird Gen215 normal exprimiert, leben nach 60 Monaten noch etwa 80% der Patienten. Wird Gen215 nicht exprimiert, leben nach 60

5 Monaten nur noch 40% der Patienten (unveröffentlicht).

[0009] Gegenstand der Erfindung sind ferner therapeutische Mittel zur Behandlung von Tumorerkrankungen, welche Substanzen enthalten, die die Expression von Genen, die Gen215 oder Gen217 kodieren, aktivieren. Diese therapeutischen Substanzen werden in die jeweiligen Tumorzellen appliziert. Bevorzugt liegen die therapeutischen Mittel in Formulierungen zur parenteralen Applikation oder zur gentherapeutischen Anwendung vor.

[0010] Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Nutzung des Expression von Gen215 als Prognosemarker

[0011] Es wird die Gen215 Expression in Biopsien durch RT-PCR Methoden oder durch Immobilisierung der entsprechenden Oligonukleotidsequenz auf einem Microarray (z. B. Genchip der Firma Affymetrix oder andere Microarrays) gemessen.

[0012] Die RT-PCR wird wie folgt durchgeführt. Karzinomgewebe wird in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Gewebs-Homogenisators aufgelöst. RNA wird extrahiert mit Hilfe der GITC Methode. Zur Quantifizierung der Expression wird die Taqman-Methode RT-PCR von Applied Systems PE benutzt. Als Referenz dient die Expression des Housekeeping-Gens beta-Aktin. Dazu wird beta-Aktin im selben Reaktionsgefäß ko-amplifiziert. Beta-Aktin wird mit folgenden Primern amplifiziert und mit der Sonde nachgewiesen:

Vorwärtsprimer: TCA GCA AGC AGG AGT ATG ACG A
Rückwärtsprimer: CGC AAC TAA GTC ATA GTC CGC C
Sonde: TET-CCA TCG TCC ACC GCA AAT GCT TC-TAMRA

40 Die Länge des Reaktionsprodukts beträgt 80 Basenpaare.

[0013] Das Gen215 wird mit folgenden Primern amplifiziert und mit der Sonde nachgewiesen:

Vorwärtsprimer: AACGGAGGAAGCTGATCCA
Rückwärtsprimer: CTCATGCTGTCTTGCAGCCA

45 Qgen215 IV Sonde: FAM-ATCCTGTGCGGGT-GACTCGGGA-TAMRA

Die Länge des Reaktionsprodukts beträgt 156 Basenpaare.

[0014] Für die Reaktion wird der Applied Systems PE Universal Master Mix 430 4437 benutzt.

[0015] In Abb. 1 ist das Überleben von Patienten mit oder ohne Expression von Gen215 im Gewebe dargestellt. Die Überlebenskurve wurde nach Kaplan-Meier erhalten und die Signifikanz der Differenzen wurde mit dem log-rank Test berechnet. Die Expression von Gen215 war hoch assoziiert (log rank, $p = 0.04$) mit dem Überleben der Patienten (X-Achse: Überlebenszeit nach der Operation in Monaten; Y-Achse: Wahrscheinlichkeit des Überlebens).

Literatur

60 (1) Michael I. Lerman and John D. Minna: The 630-kb Lung Cancer Homozygous Deletion Region on Human Chromosome 3p21.3: Identification and Evaluation of the Resident Candidate Tumor Suppressor Genes. *Cancer Res* 60, 6116-6133, 2000;
65 (2) Brett D. Kemmner W, Koch G, Roefzaad C, Gross S, Schlag PM. A rapid bioinformatic method identifies novel genes with direct clinical relevance to colon cancer. *Onc-*

gene, 2001, in press.

Patentansprüche

1. Verwendung von Splice-Varianten von Gen21 für 5 die Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekenn- 10 zeichnet, daß die Varianten Gen215 oder Gen217 be- nutzt werden.
3. Verwendung nach Anspruch 1 und 2, dadurch ge- 15 kennzeichnet, daß die Konzentration des Gen215 bzw. des Gen217 Proteins und/oder die Expressionrate der kodierenden Gene Gen215 und Gen217 in den Tumor- zellen bestimmt wird.
4. Verwendung nach Anspruch 1 bis 3, dadurch ge- 20 kennzeichnet, daß die m-RNA Expression der Splice- Varianten von Gen21 bestimmt wird.
5. Verwendung nach Anspruch 1 bis 4, dadurch ge- kennzeichnet, daß die Expressionsbestimmung mit 25 Hilfe von RT-PCR erfolgt.
6. Verwendung nach Anspruch 1 bis 5, dadurch ge- kennzeichnet, daß die Expressionsbestimmung mit Hilfe von Mikroarrays nach Immobilisierung der ent- sprechenden Oligonukleotidsequenz erfolgt.
7. Sequenz von Gen215 nach **Abb. 2.** 25
8. Sequenz von Gen217 nach **Abb. 3.**
9. Therapeutische Mittel zur Behandlung von Tumorerkrankungen, dadurch gekennzeichnet, dass sie Substanzen enthalten, die die Expression von Genen, die Splice-Varianten von Gen215 kodieren, aktivieren. 30
10. Therapeutische Mittel nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß Expression der Gene Gen215 oder Gen217 aktiviert wird.
11. Therapeutische Mittel nach Anspruch 9 und 10, 35 dadurch gekennzeichnet, daß sie als Formulierungen zur parenteralen Applikation oder zur gentherapeutischen Anwendung vorliegen.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

Gene215 und Überleben der Patienten

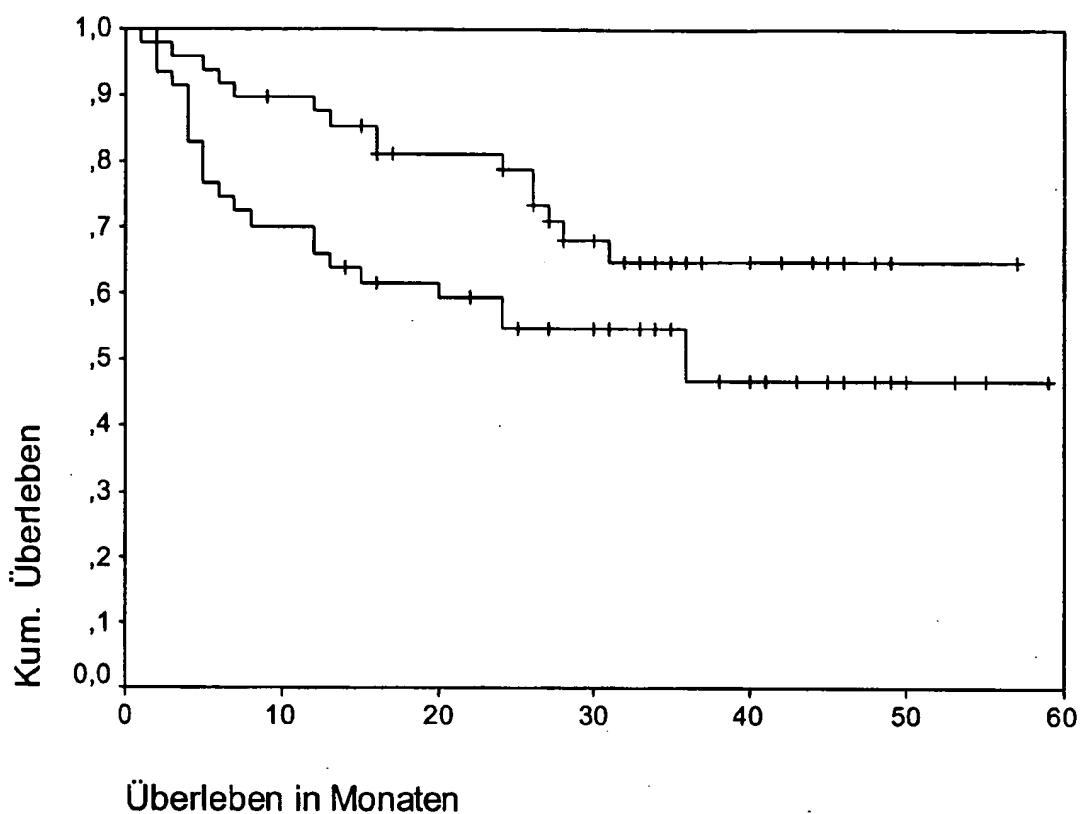


Abbildung 1

Abbildung 2: Gen215:

gacgcctctg	cgcgaggaac	gaggagctac	gggcctggc	ccggttattg	ccatggcag
cggctccgc	atcgaatgca	tattcttcag	cgagttccac	cccacgctgg	gacccaagat
cacctatcag	gtccctgaag	acttcatctc	ccgagagctg	tttgacacag	tccaaagtta
catcatcacc	aagccagagc	tgcagaacaa	gcttatcact	gtctagagag	cagctcgtg
tccatggagg	agagcaagca	gaagttggtg	cccatcatga	ccatcttgc	ggaggagcta
aatgcctcag	gcccgtgcac	tctgcccatt	gatgagtcca	acaccatcca	cttgaagggt
attgagcagc	ggccagaccc	tccggggcc	caggagtatg	atgtacctgt	ctttaccaaa
gacaaggagg	atttcttcaa	ctcacagtgg	gacctcacta	cacaacaaat	cctgcctac
attgatgggt	tccggccat	ccagaagatt	tcagcagagg	cagatgtgga	gctcaacctg
gtgcgcattg	ctatccagaa	cctgtgtac	taaggcggtt	tgacactgg	gtccatccctc
cagtactcca	atgtatactg	cccaacgccc	aagggtccagg	acctggtaga	tgacaagtcc
ctgcaagagg	catgtctatc	ctacgtgacc	aagcaagggc	acaagagggc	cagtctccgg
gatgtgttcc	agctatactg	cagcgtgac	cctggcacta	ccgtgcgaga	cctcattggc
cgccacccccc	agcagctgca	gcatgttcat	gaacggaaagc	tgatccagtt	cgggctttag
aagaacctca	tcaggcgact	acagaagtat	cctgtgcggg	tgactcggt	agagcagagc
caccctgccc	ggcttatac	aggctgccac	agctatgacg	agatctgt	caagacaggc
atagactacc	atgagctgga	tgagcggctt	gaaaatgacc	ccaaacatcat	catctgctgg
aagtggggct	ggtagtgact	ggatggacac	attgtgtgg	gtagtcctc	ctactaggag
gcttgtcata	ctgtctagag	gttgaacttt	agttctgtaa	ataaaagacat	ccatttcaaa
aaaaaaaaaa					

Abbildung 3: Gen217:

gaattcggca cgaggccctc ggcgcaggaa cgaggagcta cgggcctggg cccggttatt
 gccatggca gcccgtccg catcaatgc atattctca gcgagttcca ccccacgctg
 ggacccaaga tcacctataca ggtccctgaa gacttcatct cccgagagct gtttgacaca
 gtccaaagtgt acatcatcac caagccagag ctgcagaaca agcttatcac tgcacagct
 atggaaaaga agctgatcggt ctgtctgtg tgcatcgaa acaagaagta cagccgcaat
 gctctctct tcaacctggg cttcgtgtg gatgcccagg ccaagacctg cgcctctcgag
 cccattgtta aaaagctggc tggctatctg accacactag agctagagag cagcttcgtg
 tccatgggg agagcaagca gaagttggtg cccatcatga ccattttgtt ggaggagcta
 aatgcctcag gcccgtgcac tctgcccatt gatgagtcca acaccatcca cttgaagggt
 attgagcagc ggcacagaccc tccgggtggcc caggagtatg atgtacctgt ctttaccaaa
 gacaaggagg atttcttcaa ctcacagtgg gacctcacta cacaacaaat cctgcctac
 attgatgggt tccggccat ccagaagatt tcagcagagg cagatgtgga gctcaacctg
 gtgcgcattg ctatccagaa cctgctgtac tacggcggtt tgacactgtt gtcctatcc
 cagtactcca atgtatactg cccaaacgccc aagggtccagg acctggtaga tgacaagtcc
 ctgcaagagg catgtctatc ctacgtgacc aagcaagggc acaagagggc cagtctccgg
 gatgtgttcc agctatactg cagcgtgacc cttggcacta ccgtgcgaga cctcattggc
 cgcacccccc agcagctgca gcatgttcat gaacgggtcg aggagaattt gctggggcat
 ttgggagttt cctggggaa gctagaccct ttatgtctc caggagccct ggatcatggg
 gcaactgcca tccaaggcagg cttccctggag atgatgggct acagagacaa aattgaagg
 agactcagg aaagggttgg cctgcctgaa agaaggccctg gcccaggcgt caccggcgtcc
 tctgatccctt acccttagaa gctgatcccg ttccggctt tgaagaacct catcaggcga
 ctacagaagt atccctgtcg ggtgactcgga gaagagcaga gcccacccgtc cccggctttat
 acaggctgcc acagctatga cgagatctgc tgcagacag gcatgagcta ccatgagctg
 gatgagcggc ttgaaaatga ccccaacatc atcatctgt ggaagtggg ctggtagtga
 ctggatggac acattgtgtt ggttagtccc tccctactagg aggctgtca tactgtctag
 aggttactc ttatgttctgt aaataaaagac atccatttca aacaaaaaaaaaa